

BREVET SPÉCIAL DE MÉDICAMENT

P.V. n° 980.864

N° 4.732 M

Classification internationale : A 61 k // C 07 g

Médicaments à base de cholinestérase.

Société dite : COOPÉRATION PHARMACEUTIQUE FRANÇAISE résidant en France (Seine-et-Marne).

Demandé le 6 juillet 1964, à 16^h 12^m, à Paris.

Délivré par arrêté du 9 janvier 1967.

(Bulletin officiel de la Propriété industrielle [B.S.M.], n° 7 du 13 février 1967.)

L'invention consiste en de nouveaux médicaments contenant, comme substance active, de la cholinestérase, amenée à un état de pureté tel qu'elle soit débarrassée des impuretés protéiques telles que notamment les mucoprotéines qui l'accompagnent normalement et dont la présence empêchait jusqu'à présent son application pratique en thérapeutique.

Les susdits médicaments sont d'une innocuité absolue, ne présentent pas de phénomènes d'accoutumance et se sont révélés particulièrement intéressants dans des traitements très nombreux, dont sera plus explicitement question ci-après et parmi lesquels on peut citer les traitements de l'asthme, des dermatoses graves, des arthrites rhumatoïdes, des chocs opératoires chirurgicaux, traumatiques et obstétricaux. En outre, les médicaments selon l'invention sont remarquables dans le traitement de toutes les affections liées à des phénomènes cholinergiques tels que, par exemple, les accidents transfusionnels, les affections hématologiques, les allergies dues à l'absorption d'aliments ou antibiotiques tels que la pénicilline, les intoxications d'origine médicamenteuse. Enfin, les susdits médicaments inhibent l'histamine circulante, de même que les excès des sécrétions endogènes acétylcholiniques.

L'invention consiste, mise à part la susdite disposition principale, en certaines autres dispositions qui s'utilisent de préférence en même temps et dont sera plus explicitement question ci-après.

Elle vise plus particulièrement certains modes d'application des susdits médicaments et elle vise plus particulièrement encore lesdits médicaments à titre de produits industriels nouveaux.

Et elle pourra, de toute façon, être bien comprise à l'aide du complément de description qui suit ainsi que du dessin ci-annexé, lesquels complément et dessin sont, bien entendu, donnés surtout à titre d'indication.

La figure unique de ce dessin est une vue schématique d'un appareil utilisé dans la purification de la susdite cholinestérase.

Selon l'invention et plus spécialement selon celui

de ses modes d'application ainsi que selon ceux des modes de réalisation de ses diverses parties, auxquels il semble qu'il y ait lieu d'accorder la préférence, se proposant, par exemple, d'établir des médicaments à base de cholinestérase, on s'y prend comme suite ou de façon analogue.

On a déjà expérimenté en thérapeutique des cholinestérases plus ou moins purifiées, mais aucune application thérapeutique n'a pu être mise au point en raison notamment des chocs protéiques et des réactions de pseudo-agglutination, survenus à la suite de l'administration de ces cholinestérases, ces accidents étant dus au fait que les cholinestérases utilisées contenaient encore des impuretés protéiques et notamment des mucoprotéines.

Pour éviter les susdits inconvénients, on utilise comme substance active dans les nouveaux médicaments, de la cholinestérase conforme à l'invention, amenée à un état de pureté tel qu'elle soit débarrassée des susdites impuretés et notamment des mucoprotéines, causes des accidents constatés jusqu'alors, ladite cholinestérase étant obtenue, par exemple, par mise en œuvre du procédé décrit ci-dessous.

Suivant ce procédé, on dépolymérise la cholinestérase contenue dans une solution brute de cette dernière et on élimine de cette solution, par précipitation fractionnée, les impuretés protéiques gênantes accompagnant ladite cholinestérase, ce grâce à quoi il devient possible, au moment de la désépécification subséquente (c'est-à-dire la suppression des caractères génétiques propres à la source qui a fourni la solution brute), de faire précipiter notamment les mucoprotéines restant dans la solution.

Tous les traitements précédant la désépécification sont effectués à une température inférieure à +5 °C. de préférence en chambre froide, la désépécification elle-même étant effectuée à une température inférieure à 0 °C.

Pour ce qui est tout d'abord de la susdite solution de cholinestérase brute, on peut la préparer, par exemple, comme suit, en partant de sérum de

cheval non laqué. Il est bien entendu que le sérum de cheval contient des taux de cholinestérase très variables suivant les abattages, le rendement global du procédé étant modifié en conséquence. On agite violemment une certaine quantité dudit sérum, la mousse formée étant, le cas échéant, détruite à l'aide d'alcool octylique, avant d'ajouter un sel neutre cristallisé, de préférence du sulfate d'ammonium, la quantité de sel utilisée étant, dans le cas du sulfate d'ammonium, d'environ 1 kg pour 5 litres de sérum. Il est important d'ajouter le sulfate d'ammonium très lentement, en au moins 30 minutes.

On continue alors l'agitation du mélange pendant un certain temps avant de l'abandonner pendant 6 à 12 heures, après quoi, on procède à une filtration sur filtre-pressé, précédée d'une centrifugation lorsque le sérum a été conservé en glacière. On élimine ainsi environ 1 kg à 1,5 kg de produit solide par 10 litres de sérum au départ.

Pour insolubiliser les protéines gênantes sans précipiter la cholinestérase, on abaisse alors le pH du filtrat ainsi obtenu à 3,5. A cet effet, on a recours, de préférence, à de l'acide sulfurique en raison du fait qu'il y a déjà des ions sulfate dans la solution. Pour ne pas risquer des dénaturations partielles à cause d'une concentration trop forte de l'acide sulfurique et pour ne pas diluer en outre le sérum d'une façon trop importante, on utilise, avantageusement, étant donné le pouvoir tampon très constant du sérum de cheval, l'acide sulfurique avec une concentration voisine de 5N, la quantité nécessaire s'élevant alors à environ 1 litre d'acide pour 40 litres de sérum initial.

Après un repos d'une douzaine d'heures, on soumet le mélange à une nouvelle filtration, sur filtre-pressé, par exemple, on élimine ainsi environ 2 à 3 kg de produit solide par 10 litres de sérum, puis on précipite, à l'aide de sulfate d'ammonium en quantité environ deux fois plus faible que plus haut, la cholinestérase contenue dans le filtrat en entraînant certaines impuretés.

Cette précipitation étant très longue, les protéines recherchées ne devenant insolubles qu'après un repos prolongé, ce n'est qu'au bout d'une douzaine d'heures que l'on décante et centrifuge la solution ainsi traitée, ce qui permet d'obtenir un produit solide (environ 1 à 2 kg pour 200 litres de sérum initial) contenant la cholinestérase accompagnée de ses impuretés, ledit produit solide étant alors dissous dans l'eau (à raison d'environ 1 g de produit dans 6 ml d'eau) pour donner la susdite solution brute qui présente, en général, un taux de purification d'environ 22 fois.

On signale ici que l'on entend par « taux de purification » le rapport, pour une cholinestérase donnée et à un stade donné de sa purification, du nombre « d'unités de cholinestérase » par mg d'azote

de la solution de cholinestérase au stade envisagé de la purification sur le nombre « d'unités de cholinestérase » par mg d'azote du sérum de départ. Le « taux de purification » peut être représenté par la formule :

$$\text{Taux de purification} = \frac{\text{Nombre d'unités de cholinestérase par mg d'azote de la solution}}{\text{Nombre d'unités de cholinestérase par mg d'azote du sérum de départ}}$$

On détermine lesdits nombres « d'unités de cholinestérase » en précisant tout d'abord le nombre « d'unités de cholinestérase » par ml respectivement de solution et de sérum, puis en dosant le nombre de mg d'azote par ml respectivement de solution et de sérum, sachant que l'on désigne par « unité de cholinestérase » la quantité de produit nécessaire pour hydrolyser une micromolécule (c'est-à-dire un millionième du poids moléculaire) d'acétylcholine en 1 heure, à pH 7,4 et à une température voisine de 25 °C. Pour déterminer le nombre « d'unités de cholinestérase » d'une solution de cholinestérase donnée, on peut, par exemple, déterminer la quantité de soude N/100 nécessaire pour maintenir, pendant 1 heure à 7,4, le pH dans un bécher contenant, en présence d'acétylcholine, une quantité donnée de la solution de cholinestérase à étudier, la soude neutralisant l'acide acétique au fur et à mesure de sa formation par hydrolyse de l'acétylcholine sous l'influence de la cholinestérase.

La solution brute de cholinestérase, obtenue ainsi que décrit plus haut ou de toute autre manière convenable est ensuite soumise au traitement précédant la désépécification, traitement dont il va être plus particulièrement question ci-après.

Dans le cadre de ce traitement, on réalise une première précipitation en ajoutant très lentement (en plus d'une heure) une solution saturée du sel neutre utilisée dans la préparation de la solution brute (pour ne pas introduire d'autres ions) en l'occurrence de sulfate d'ammonium, en une proportion de 6,6 volumes pour 10 volumes de cholinestérase brute, ce qui permet d'atteindre une saturation partielle bien définie, égale à 40 %. Après un repos d'une douzaine d'heures, on sépare par centrifugation le précipité d'impuretés formé, puis on traite le centrifugat (terme par lequel on désigne, dans ce qui suit, le liquide surnageant) par une quantité de sulfate d'ammonium cristallisé suffisante pour atteindre une saturation correspondant à 67 %, ajoutée très lentement, ce qui permet d'obtenir, après un repos d'une douzaine d'heures, un précipité contenant la cholinestérase, précipité que l'on isole par centrifugation et que l'on met ensuite en solution aqueuse à pH 3,5, de préférence à l'aide d'un solvant constitué par un tampon d'acétate de sodium 0,1 M.

On traite cette solution à son tour par une solu-

tion de sulfate d'ammonium saturée en utilisant à peu près 800 ml de sulfate pour 1 litre de solution de cholinestérase et, après un repos d'une douzaine d'heures, à une température voisine de 4 °C, on sépare par centrifugation le précipité formé qui contient des impuretés puis on traite de nouveau le centrifugat par une solution saturée de sulfate d'ammonium pour obtenir une saturation de 66 % en sulfate d'ammonium, avant de l'abandonner de nouveau à une température de 4 °C pendant une douzaine d'heures, à la suite de quoi on peut séparer une fois de plus par centrifugation un précipité contenant la cholinestérase.

Ce précipité peut alors être soumis à une purification par dialyse après dissolution dans l'eau distillée, toujours à la même température de 4 °C le aux de purification de la solution dialysée atteignant alors 500.

C'est seulement après cette succession de précipitations que l'on effectue la désépécification qui, dans ces conditions, permet la précipitation des mucoprotéines dans une première étape et la précipitation de la cholinestérase dans une deuxième étape. On effectue la désépécification de préférence à l'aide d'alcool éthylique.

Pour précipiter tout d'abord les mucoprotéines, on amène le pH de la solution dialysée à 4,9 en utilisant, de préférence, une solution de carbonate de sodium additionnée d'acide acétique, le pH de 4,9 étant celui auquel la dénaturation est minimum, puis on ajoute par petites fractions et on abaissant graduellement la température du mélange réactionnel à -3 °C, une quantité d'alcool éthylique, suffisante pour amener la solution à un titre alcoolique d'environ 10 degrés.

Après une agitation d'environ 3 heures à -3 °C, on peut considérer que la susdite précipitation est terminée, on isole le précipité par centrifugation et on précipite la cholinestérase contenue dans le centrifugat en ajoutant, par petites fractions, une nouvelle quantité du susdit alcool, suffisante pour mener la solution à un titre alcoolique voisin de 10 degrés, après avoir amené le pH du centrifugat

4,4 de préférence à l'aide d'une solution d'acétate de sodium et d'acide acétique. Au cours de l'addition d'alcool, on abaisse progressivement la température du mélange réactionnel à -5 °C.

Le précipité que l'on obtient ainsi est ensuite séparé par centrifugation du liquide surnageant. On le dissout dans de l'eau, puis on le soumet à une dialyse, ce qui conduit à une solution de cholinestérase dont le taux de purification est voisin de 1 600.

Il est avantageux de compléter la purification de la solution de cholinestérase ainsi obtenue par un traitement de décantation au sein d'un champ électrique, ce traitement étant mis en œuvre à l'aide d'un appareil tel que celui qui a été décrit dans

la demande de brevet français déposée par la société demanderesse le 3 juillet 1964 sous le titre « Perfectionnements apportés aux moyens pour la purification des protéines ».

Le susdit appareil, qui est représenté sur la figure unique extraite de la susdite demande, est constitué par une enceinte tubulaire 1, disposée verticalement, dans laquelle on place la solution de cholinestérase à purifier. Aux extrémités supérieure et inférieure de l'enceinte 1, on fixe respectivement une capsule 11 et 12, la séparation entre l'intérieur de l'enceinte et l'intérieur de chacune des capsules étant constituée par une membrane à propriétés dialysantes 13, des électrodes 2 et 3 étant logées respectivement dans les capsules 11 et 12 qui sont remplies par un électrolyte toujours renouvelé à pH aussi constant que possible et égal à celui de la solution de cholinestérase contenue dans l'enceinte 1, qui est refroidie grâce à un manchon 4 dans lequel peut circuler un liquide réfrigérant sous l'impulsion d'une pompe 5.

Après avoir amené le pH de la solution de cholinestérase, à l'aide d'un acide faible, de préférence l'acide borique à faible concentration (par exemple 0,05 M), à la valeur qui correspond au point iso-électrique de cette dernière, c'est-à-dire à 3,5 et après avoir établi dans les deux capsules 11 et 12, grâce aux pompes 17 et 18, une circulation d'une solution tampon qui est également à pH 3,5 et qui est constituée, de préférence, par un tampon à base de borate de sodium et d'acide borique, on établit, à l'aide des électrodes 2 et 3, un champ électrique continu, d'intensité suffisante pour provoquer la migration, vers les électrodes, des impuretés accompagnant la cholinestérase et subsistant encore dans la solution. On favorise cette migration en donnant au champ électrique une orientation telle que la migration de la plus grande partie desdites impuretés soit favorisée par la pesanteur.

Pendant cette séparation, qui dure plusieurs heures, on maintient la température de l'enceinte à environ -2 °C.

Les impuretés se rassemblant au voisinage des extrémités de l'enceinte 1, on obtient, dans la partie centrale de cette dernière, une solution de cholinestérase dont le taux de purification est voisin de 3 000.

On peut alors soumettre cette solution de cholinestérase à une dernière dialyse puis la lyophiliser après lui avoir ajouté, le cas échéant, des adjuvants de lyophilisation tels que la polyvinylpyrrolidone et des substances favorisant sa dissolution ultérieure, telles que le phosphate de sodium.

Le rendement de ce procédé est voisin de 15 à 20 % de la théorie.

Ci-dessous on donne, à titre illustratif, un exemple concernant la mise en œuvre du procédé qui vient d'être décrit, cet exemple n'ayant aucun carac-

rière limitatif ni restrictif.

Exemple. — On place 200 litres de sérum de cheval non laqué dans un récipient de 400 litres, on agite violemment tout en détruisant la mousse formée à l'aide d'une pulvérisation d'alcool octylique et on ajoute, en 30 minutes, 40 kg de sulfate d'ammonium cristallisé. On continue l'agitation pendant 1 heure, puis on laisse reposer l'ensemble à 4 °C pendant une nuit. On filtre ensuite sur filtre-pressé, à raison d'une plaque pour 10 litres de sérum, ce qui permet de retirer 20 kg de produit solide, puis on agite de nouveau violemment le filtrat en détruisant la mousse à l'aide d'une pulvérisation d'alcool octylique avant d'ajouter, au sein du liquide, 5 litres d'acide sulfurique 5N pour amener le pH à 2,8. L'addition d'acide sulfurique est effectuée très lentement, en deux étapes, entrecoupées par un repos de 2 heures lorsque les deux premiers tiers du volume d'acide sulfurique ont été ajoutés. Après l'addition d'acide sulfurique, on abandonne la solution pendant une nuit avant de la soumettre à une nouvelle filtration sur filtre-pressé, à l'aide de 25 plaques, puis on ajoute, sous forme de brouillard, 22 kg de sulfate d'ammonium en agitant la solution, cette addition étant effectuée en une demi-heure environ. On abandonne ensuite la solution de nouveau pendant une nuit à une température de 4 °C avant de la faire passer dans une centrifugeuse réfrigérée, ce qui permet d'obtenir 1,5 kg de produit solide se présentant sous la forme d'une pâte que l'on redissout dans 9 litres d'eau. On ajoute ensuite, à cette solution, très lentement, 6 litres d'une solution de sulfate d'ammonium saturée, puis on laisse reposer une nuit et l'on centrifuge ensuite pendant 2 heures à 2 200 trs/mn, à l'aide d'une centrifugeuse d'un diamètre de 60 cm. Le centrifugat est ensuite additionné, très lentement et en agitant, de 1 800 g de sulfate d'ammonium cristallisé puis abandonné pendant une nuit avant que l'on isole, par centrifugation, le précipité formé (environ 300 g). On dissout ce précipité dans un litre de tampon, constitué par de l'acétate de sodium 0,1M à pH 3,5, puis on ajoute, en agitant, 810 ml d'une solution de sulfate d'ammonium saturée avant de laisser reposer de nouveau pendant une nuit à la température de 4 °C. Après avoir séparé le précipité formé par une nouvelle centrifugation, on traite le centrifugat par une solution de sulfate d'ammonium, à raison de 610 ml de cette solution par litre de solution de cholinestérase puis, après un repos d'une nuit à 4 °C, on sépare par centrifugation le précipité qui, après dissolution dans 100 ml d'eau distillée et après une dialyse effectuée toujours à la température de 4 °C, conduit à une solution dont le taux de purification est égal à 500. On déspecifie cette solution à l'aide d'alcool éthylique en ajoutant, par petites fractions successives, 223 ml d'al-

cool à 53,3 % après avoir amené le pH à 4,9 à l'aide de 100 ml d'une solution de carbonate acide de sodium, additionnée d'acide acétique. Au cours de l'addition d'alcool, on abaisse progressivement la température à -3 °C, et, avant de centrifuger et d'isoler le centrifugat, on maintient la solution à cette température pendant 3 heures. On ajuste ensuite le pH du centrifugat à 4,4 en utilisant 50 ml d'une solution d'acétate de sodium et d'acide acétique, puis on ajoute par petites fractions 280 ml d'alcool à 53,3 % en abaissant la température progressivement à -5 °C. On isole, par centrifugation, le précipité formé, puis on le dissout dans de l'eau et on dialyse la solution obtenue avant de la soumettre à une décantation dans l'appareil décrit plus haut. A cet effet, on ajuste son pH à 3,5, à l'aide d'une solution d'acide borique 0,05 M. Après avoir fait passer un courant de 150 mA pendant 6 heures sous une différence de potentiel de 1 500 à 2 000 volts tout en maintenant la solution à -2 °C, on obtient 900 ml d'une solution dont le taux de purification est égal à 3 000. Après lyophilisation, on obtient un produit sec contenant environ quatre millions d'unités de cholinestérase ce qui correspond à un rendement de 20 % de la théorie.

Il est bien entendu que l'invention vise non seulement la cholinestérase obtenue par le procédé qui vient d'être décrit mais également toute cholinestérase amenée, par tout autre procédé, à l'état de pureté défini plus haut.

Pour démontrer l'innocuité absolue de la cholinestérase amenée au susdit état de pureté, par exemple, à l'aide du procédé qui vient d'être décrit on a effectué des essais de toxicité aiguë et des essais de toxicité chronique sur des lapins, cobayes et rats, le mode d'administration utilisé étant la voie intraveineuse.

Dans le cas des essais de toxicité aiguë, on a injecté aux animaux de laboratoire susmentionnés une solution de cholinestérase purifiée aussi concentrée que possible sans enregistrer de cas mortel ni de symptôme d'intolérance. Il n'a donc pas été possible de déterminer une dose toxique. On n'a été limité dans ces essais que par la quantité de liquide qu'il était possible d'injecter aux animaux. Les seuls phénomènes toxiques ou même mortels, que l'on a pu provoquer, étaient dus à la trop grande dilution du sang et n'avaient aucun rapport avec la cholinestérase proprement dite. Pour éviter une trop grande dilution du sang, on n'a pu injecter aux animaux traités des doses supérieures à 3 000 fois la dose thérapeutique la plus élevée.

En ce qui concerne les essais de toxicité chronique, ils ont consisté à faire à des lapins et à des rats des injections, répétées tous les deux jours pendant deux mois, d'une quantité de médicament contenant chaque fois une dose de cholinestérase

correspondant à mille fois la dose thérapeutique la plus élevée. A la fin de ces essais, les animaux traités n'ont présenté aucun symptôme toxique ni aucune modification anatomopathologique, que ce soit sur le système nerveux central, la moëlle ou les divers viscères.

Il a, par contre, été possible de provoquer des accidents graves en injectant aux susdits animaux le laboratoire de la cholinestérase prélevée à différents stades intermédiaires du susdit procédé de préparation et, par suite, incomplètement purifiée.

Dans cet ordre d'idées, on signale qu'en prélevant de la cholinestérase au stade correspondant à un taux de purification égal à 22 et en faisant des injections intraveineuses de cette cholinestérase à des lapins et à des cobayes, la dose létale pour le cobaye a été trouvée égale à 500 unités de cholinestérase incomplètement purifiée, cette dose provoquant la mort par arrêt respiratoire suivi d'arrêt cardiaque, 2 minutes après l'injection. Compte tenu de son poids, le lapin résiste à des doses dix fois supérieures.

On a ensuite utilisé une cholinestérase présentant un taux de purification égal à 500 et on a constaté que l'injection d'une dose de 1 000 unités de cette cholinestérase à un cobaye de 250 g suscite chez l'animal un choc intense avec miction, contraction musculaire violente et apnée. Au bout de quelques minutes la respiration s'accélère, devient très saccadée puis retourne lentement à la normale. L'injection de cette même cholinestérase ne provoque aucun symptôme important chez le lapin mais, aux doses maximum susceptibles d'être injectées, on constate une contracture des mâchoires accompagnée de salivation et miction importantes. Les résultats d'essais de toxicité chronique effectués avec ces mêmes cholinestérases partiellement purifiées, ont corroboré ceux obtenus lors des essais de toxicité aiguë.

La cholinestérase convenablement purifiée, par exemple, à l'aide du procédé décrit ci-dessus, peut être administrée notamment par les voies parentérale, orale, rectale, dermique et perlinguale, de même que sous la forme d'aérosol et de collyre, cette administration pouvant avoir lieu par toutes les cavités naturelles.

Elle se présente généralement à l'issue du susdit procédé, sous l'aspect d'une poudre blanche lyophilisée, parfaitement soluble dans l'eau, stérile et apyrogène. Cette poudre est ensuite conditionnée en vue de son utilisation ultérieure sous la forme de solutions injectables, de suppositoires préparés généralement à partir d'un excipient anhydre hydrophobe, sous la forme de comprimés enrobés de façon à ne pas prendre l'humidité, et sous toute autre forme convenable.

Les indications thérapeutiques des médicaments conformes à l'invention sont très nombreuses et on

va énumérer, ci-après, les plus importantes d'entre elles en donnant dans chaque cas particulier des indications sur la posologie.

1° Application au traitement de l'asthme.

Dans le cas de l'asthme endogène, la cholinestérase, administrée par aérosol ou par la voie endoveineuse, supprime les crises les plus violentes car elle agit directement sur la cause même de ces crises, savoir la contraction brutale des bronches. Suivant l'état clinique du malade, on lui administre par exemple entre 1 000 et 20 000 unités de cholinestérase, la fréquence de cette administration étant réglée en fonction des symptômes cliniques. On a constaté, que chez certains malades, l'effet d'une injection pouvait se prolonger pendant un mois et demi. Par contre, aucun effet d'accoutumance ni de sensibilisation n'a pu être mis en évidence.

2° Application au traitement des dermatoses.

Les médicaments à base de cholinestérase conforme à l'invention provoquent une amélioration spectaculaire des dermatoses graves lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse. Ils sont particulièrement appropriés dans les cas de lupulus, d'urticaire rhumatoïde, de lichens, d'herpès, de purpura leucémique, de pemphigus vulgaris et autres. Suivant l'intensité de la maladie et les signes cliniques, la dose moyenne est comprise entre 50 000 et 100 000 unités de cholinestérase.

3° Application au traitement des arthrites rhumatoïdes.

On améliore les cas d'arthrite rhumatoïde en appliquant le traitement par injection de cholinestérase. Les doses utilisées sont à peu près identiques à celles prescrites pour les dermatoses.

4° Application au traitement des chocs.

Il est possible de lever, dans un bref délai, les états de choc provoqués par des interventions chirurgicales ou obstétricales, de même que ceux qui résultent de traumatismes, de brûlures ou de utilisation du garrot, en administrant au patient une injection de 50 000 unités de cholinestérase.

5° Application au traitement de l'apnée.

L'apnée due à l'emploi de la succinylcholine et de ses dérivés ou à des substances analogues peut être levée en une dizaine de secondes par une injection intraveineuse d'environ 45 000 unités de cholinestérase.

6° Application au traitement des affections hémato-logiques.

Il est admis que la plupart des affections hémato-logiques peuvent être considérées comme des phénomènes cholinergiques. L'administration de médicament à base de cholinestérase conforme à l'invention permettant alors d'obtenir une amélioration nette quelle que soit la cholinestérasémie du sujet.

En effet, notamment les accidents transfusionnels, les anémies, les déficiences de l'érythropoïèse et les allergies dues soit à de la nourriture, soit à une

intoxication médicamenteuse, sont la conséquence d'une décharge qui n'est plus compensée par un taux suffisamment élevé de cet enzyme dans le sang.

On a notamment pu mettre en évidence l'action bénéfique de la cholinestérase dans les affections hématologiques suivantes :

L'administration de cholinestérase par voie intraveineuse provoque une rémission de l'anémie macrocytaire qui est occasionnée par l'acétylcholine;

L'injection de cholinestérase permet d'observer le rétablissement de la formule sanguine dans les cas d'anémies aiguës de toute nature à l'exception de celles qui n'atteignent pas la moëlle osseuse, c'est-à-dire par exemple celles dues à des hémorragies où à la privation de fer de l'organisme;

L'administration de cholinestérase a pour conséquence d'augmenter l'érythropoïèse et de provoquer une réponse réticulocytaire, entraînant un accroissement du nombre des hématies;

Enfin, l'administration de cholinestérase permet d'obtenir une rémission dans les leucoses aiguës ainsi que dans certaines leucémies chroniques, dans les leucémies à myélomes multiples, dans les érythroblastoses de même que dans les leucémies monocytaires aiguës, les leucémies myéloïdes aiguës, les lymphogranulomatoses, les neutropénies et les thrombopénies, ainsi que dans toutes les anémies aplasiques, c'est-à-dire ayant pour cause une déficience de la moëlle osseuse.

La détermination de la posologie est assez complexe dans tous ces cas d'affections hématologiques et elle dépend, d'une part, des signes cliniques présentés par le malade et, d'autre part, de son taux de cholinestérase sanguine. Les quantités de cholinestérase à administrer seront donc déterminées de telle sorte que le taux de cholinestérase du malade soit maintenu à une valeur normale, c'est-à-dire environ 150 unités de cholinestérase par millilitre de sérum.

Etant donné la chute importante du taux de cholinestérase dans les affections hématologiques qui viennent d'être énumérées, il est possible d'envisager, à titre de règle générale, l'administration de doses comprises entre 500 000 et 1 000 000 unités.

Cependant la posologie exacte devra être déterminée par un clinicien en fonction de chaque cas à traiter.

Egalement à titre de règle générale, on peut conseiller un traitement d'attaque par voie intraveineuse dans toutes les maladies et non seulement les affections hématologiques citées plus haut, ce traitement d'attaque étant suivi par un traitement d'entretien par voie rectale ou par aérosols dans les cas de l'asthme, la posologie pendant ledit traitement d'entretien étant alors d'environ le double de celle utilisée dans le traitement d'attaque par voie intraveineuse.

Il est également possible d'envisager, pour le

traitement d'entretien, l'administration par voie orale ou perlinguale de comprimés représentant, par 24 heures, trois à quatre fois la dose administrée par voie intraveineuse lors du traitement d'attaque.

Ci-après, on donne, à titre documentaire, quelques essais cliniques réalisés à l'aide de médicaments à base de cholinestérase conforme à l'invention :

a. Application au traitement de l'asthme :

Une patiente de 38 ans, atteinte d'asthme depuis 15 ans et régulièrement hospitalisée, a été traitée pendant un mois sous oxygène sans amélioration ni soulagement; l'amélioration attendue par les traitements classiques ne s'est pas produite et même les injections d'adrénaline n'arrivaient pas à soulager la malade; il lui a été administré une injection de 70 000 unités de cholinestérase et au bout de 3 heures, elle fut soulagée de l'oppression; l'injection a été renouvelée une semaine après et la patiente ne ressent aucune indisposition et il ne fut pas observé de réaction secondaire ni aucune récédive trois mois et demi après le traitement;

Un patient de 61 ans, atteint d'asthme grave depuis 16 ans compliqué d'emphysème, a été hospitalisé deux fois et a subi des cures thermales et des séjours en altitude moyenne; ce malade présentait en outre des complications cardiaques; il est arrivé à la consultation en pleine crise d'asthme; à cause de son état inquiétant ce patient a été traité par 100 000 unités de cholinestérase; le lendemain de l'hospitalisation, on a noté un net soulagement de l'oppression qui disparut après 36 heures; six jours plus tard on a renouvelé l'injection de cholinestérase à la dose de 50 000 unités puis, la semaine suivante, on a pratiqué une troisième injection de 50 000 unités; quatre mois après ce traitement, on a pu noter une amélioration de la fonction cardiaque et il n'a pas été observé d'autre crise oppressive.

b. Application au traitement des dermatoses :

On a traité 20 malades, atteints de dermatoses et hypersensibles à de nombreux médicaments, en leur administrant, séparées par un intervalle de 72 heures, deux doses de 10 000 à 50 000 unités; on a pu noter des rémissions complètes et définitives dans les cas de dermatoses médicamenteuses (6 cas) d'herpès (2 cas) de purpura dû à une allergie alimentaire (1 cas) de lupus érythémateux (2 cas) et d'eczéma (4 cas); les cinq autres cas ont donné des réponses équivoques et sont restés en traitement.

c. Application au traitement des affections hématologiques :

De nombreux cas d'affections hématologiques ont été traités par la cholinestérase et on a pu constater une rémission nette dans la majorité de ces cas; on citera en particulier le cas d'une anémie

macrocytaire qui, après l'injection de 100 000 unités de cholinestérase, a présenté une rémission nette au bout de 5 à 6 jours, la formule globulaire étant redevenue normale au bout de 6 mois;

Une patiente de 54 ans, atteinte de leucémie lymphoïde, présentant une tumeur de l'hypocondre gauche avec splénomégalie et dont la formule sanguine était la suivante :

Globules rouges : 3 500 000;
Globules blancs : 52 000;
Polynucléaires neutrophiles : 6 %;
Polynucléaires éosinophiles : 0 %;
Polynucléaires basophiles : 0 %;
Petits lymphocytes : 2 %;
Grands lymphocytes : 92 %;
Monocytes : 0 %;
Valeur globulaire : 0,90;

a reçu une injection de 400 000 unités de cholinestérase puis, à trois jours d'intervalle, deux autres de 50 000 unités de cholinestérase; au bout de 15 jours suivant ce traitement, la forme sanguine de cette patiente est devenue :

Globules rouges : 5 800 000;
Globules blancs : 8 000;
Polynucléaires neutrophiles : 65 %;
Polynucléaires éosinophiles : 1 %;
Polynucléaires basophiles : 0,5 %;
Petits lymphocytes : 20 %;
Grands lymphocytes : 5 %;
Monocytes : 8,5 %;
Valeur globulaire : 0,70.

On a constaté que cette formule sanguine n'avait pas encore changé au bout de 6 mois.

On a déterminé la formule sanguine d'un patient de 22 ans, apparemment en bonne santé, mais présentant une fatigue générale accentuée, ainsi qu'une pâleur et des hématomes fréquents; l'examen de sa formule sanguine, donnée ci-dessous, a montré que le patient était atteint d'une leucémie myéloïde aiguë :

Globules rouges : 3 200 000;
Globules blancs : 80 000;
Myélocytes neutrophiles : 32 %;
Myélocytes éosinophiles : 2 %;
Myélocytes basophiles : 0 %;
Méta-Myélocytes neutrophiles : 8 %;
Méta-Myélocytes éosinophiles : 0 %;
Méta-Myélocytes basophiles : 0 %;
Polynucléaires neutrophiles : 29 %;
Polynucléaires éosinophiles : 3 %;
Polynucléaires basophiles : 1 %;
Petits lymphocytes : 15 %;
Grands lymphocytes : 4 %;
Monocytes : 6 %;
Plaquettes : 110 000.

On a traité ce malade par une première administration de 200 000 unités de cholinestérase par voie intraveineuse puis, à des intervalles de deux

jours, par 4 injections de 50 000 unités de cholinestérase; au bout de 15 jours la formule sanguine de ce patient était la suivante :

Globules rouges : 5 800 000;
Globules blancs : 11 000.

On ne trouvait plus, comme éléments anormaux que 3 % de myélocytes neutrophiles et 2 % de méta-myélocytes neutrophiles, le reste de la formule étant normal et le nombre de plaquettes atteignant 200 000; au cours des 8 mois suivant ce traitement, la formule sanguine de ce malade n'a pas changé, une injection d'entretien de 100 000 unités lui ayant été administrée quatre mois après le début du traitement.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application, non plus qu'à ceux des modes de réalisation de ses diverses parties, ayant été plus spécialement indiqués; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes.

RÉSUMÉ

1° L'invention consiste en de nouveaux médicaments contenant, comme substance active, de la cholinestérase, amenée à un état de pureté tel qu'elle soit débarrassée des impuretés protéiques telles que notamment les mucoprotéines qui l'accompagnent normalement et dont la présence empêchait jusqu'à présent son application pratique en thérapeutique.

2° La susdite cholinestérase peut être préparée en dépolymérisant la cholinestérase contenue dans une solution brute de cette dernière et en éliminant de cette solution, par précipitation fractionnée, les impuretés protéiques gênantes accompagnant ladite cholinestérase, ce grâce à quoi il devient possible, au moment de la désépécification subséquente, de faire précipiter notamment les mucoprotéines restant dans la solution.

3° Les susdits médicaments sont d'une innocuité absolue, ne présentent pas de phénomène d'accoutumance et sont particulièrement intéressants dans :

Le traitement de l'asthme;
Le traitement des dermatoses;
Le traitement des arthrites rhumatoïdes;
Le traitement des chocs opératoires chirurgicaux, traumatiques et obstétricaux;
Le traitement des accidents transfusionnels;
Le traitement des affections hématologiques;
Le traitement des allergies et des intoxications.

4° Les susdits médicaments sont administrés notamment par les voies parentérale, orale, rectale, dermique, par aérosol ou sous forme de collyre.

5° Les susdits médicaments sont administrés aux doses posologiques approximatives (car variables notamment avec l'état clinique du patient) suivantes :

1 000 à 20 000 unités de cholinestérase dans le cas du traitement de l'asthme;

[4 732 M]

— 8 —

50 000 à 100 000 unités de cholinestérase dans le cas du traitement des dermatoses suivant la nature de ces dernières;

50 000 unités dans le traitement des chocs opératoires chirurgicaux, traumatiques et obstétricaux;

45 000 unités de cholinestérase dans le cas du traitement de l'apnée;

500 000 à 1 000 000 d'unités de cholinestérase dans le cas du traitement des affections hémato-logiques.

Société dite :

COOPÉRATION PHARMACEUTIQUE FRANÇAISE

Par procuration :

PLASSERAUD, DEVANT, GOTMANN, JACQUELIN, LEMOINE

AVIS DOCUMENTAIRE SUR LA NOUVEAUTE

Documents susceptibles de porter atteinte à la nouveauté du médicament :

— *Arzneimittelforschung*, n° 4, avril 1954, p. 242-248, cite K.B. Augustinsson.

Le présent avis a été établi après les observations présentées par le titulaire du brevet.

N° 4.732 M

Société dite :
Coopération Pharmaceutique Française

Pl. unique

